

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

Offenlegungsschchrift

(10) DE 43 39 533 A 1

(51) Int. Cl. 6:

C 07 K 16/00

C 07 H 21/04

G 01 N 33/563

G 01 N 33/564

- (21) Aktenzeichen: P 43 39 533.3
(22) Anmeldetag: 19. 11. 93
(23) Offenlegungstag: 14. 6. 95

(71) Anmelder:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

(74) Vertreter:

Deufel, P.; Dipl.-Wirtsch.-Ing. Dr.rer.nat.; Hertel, W.;
Dipl.-Phys.; Rutetzki, A.; Dipl.-Ing.Univ.; Rucker, E.;
Dipl.-Chem. Univ. Dr.rer.nat.; Huber, B.; Dipl.-Biol.
Dr.rer.nat.; Becker, E.; Dr.rer.nat.; Kurig, T.;
Dipl.-Phys. Dr.-Ing.; Steil, C.; Dipl.-Ing.,
Pat.-Anwälte, 80331 München

(62) Teil in: P 43 45 249.3

(72) Erfinder:

Zentgraf, Hanswalter, Dipl.-Biol. Dr., 69155
Heidelberg, DE; Klein, Ralf, Dipl.-Biol. Dr., 68259
Mannheim, DE; Frey, Manfred, Dipl.-Chem. Dr.,
68259 Mannheim, DE; Martens, Regina, 68799
Reilingen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Nachweisverfahren für hdm-2 spezifische Antikörper

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von hdm-2-spezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Trägermaterial-gebundenes hdm-2 und/oder Bindungsregionen für hdm-2-spezifische Antikörper aufweisende Fragmente davon mit Körperflüssigkeiten inkubiert und die spezifischen, an das hdm-2 und/oder die Fragmente gebundenen Antikörper (a)
- mit markierten, gegen die Antikörper (a) gerichteten Antikörpern (b),
oder
- mit unmarkierten Antikörpern (b) und letztere mit markierten, gegen die Antikörper (b) gerichteten Antikörpern (c) reagieren läßt.

Ferner betrifft die Erfindung hierfür verwendbare Kits. Des weiteren betrifft sie hdm-2-Fragmente und die sie codierenden DNA-Sequenzen, wobei die Fragmente Bindungsregionen für hdm-2-spezifische Antikörper aufweisen und Verfahren zu ihrer Herstellung.

BEST AVAILABLE COPY

DE 43 39 533 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 04. 95 508 024/15

13/33

DE 43 39 533 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von hdm-2-spezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten. Ferner betrifft sie einen hierfür verwendbaren Kit. Des weiteren betrifft die Erfindung hdm-2-Fragmente und die sie codierenden DNA-Sequenzen, wobei die Fragmente Bindungsregionen für hdm-2-spezifische Antikörper aufweisen, und Verfahren zu ihrer Herstellung.

Das menschliche Genom umfaßt ein mit hdm-2 (human-double-minute gene 2) bezeichnetes Gen. Dieses Gen weist große Homologien zum entsprechenden mdm-2-Gen (murine-double-minute gene 2) der Maus auf. Das Expressionsprodukt des hdm-2-Gens ist ein Protein, dessen Primärstruktur bekannt ist, und das 491 Aminosäuren aufweist (vgl. Oliner, J.D. et al., Nature 358 (1992), 80–83). Dieses Protein wird nachstehend mit hdm-2 bezeichnet.

Es ist bekannt, daß das hdm-2-Gen bei Sarkomen häufig in amplifizierter Form vorliegt. Es findet sich dann auch eine erhöhte Expression von hdm-2. Dies kann mit dem Vorliegen spezifischer gegen hdm-2 gerichteter Antikörper einhergehen. Der Nachweis solcher Antikörper könnte daher zur Diagnose spezieller Krebserkrankungen genutzt werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Nachweis von hdm-2-spezifischen Antikörpern bereitzustellen.

Erfnungsgemäß wird dies in einem Verfahren erreicht, bei dem man Trägermaterial-gebundenes hdm-2 und/oder Trägermaterial-gebundene, Bindungsregionen für hdm-2-spezifische Antikörper aufweisende Fragmente davon mit Körperflüssigkeiten inkubiert und die spezifischen an das hdm-2 und/oder die Fragmente gebundenen Antikörper (a)

- mit markierten, gegen die Antikörper (a) gerichteten Antikörpern (b), oder
- mit unmarkierten Antikörpern (b) und letztere mit markierten, gegen die Antikörper (b) gerichteten

Antikörpern (c) reagieren läßt.

Der Ausdruck "hdm-2" umfaßt ein hdm-2-Protein mit Wildtyp-Sequenz. Ein solches kann aus Zellen, wie A-204 (humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie, Tumorbank, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) isoliert werden. hdm-2 kann auch eine von der Wildtyp-Sequenz abweichende Sequenz haben. Eine solche kann Additionen, Deletionen und/oder Substitutionen von ein oder mehreren Aminosäuren aufweisen. Ferner kann hdm-2 Teil eines Fusionsproteins sein. Ein solches wie auch jedes andere hdm-2 kann aus Zellen isoliert werden, die es nach Genmanipulation exprimieren. Solche Zellen umfassen prokaryotische und eukaryotische Zellen. Beispiele ersterer sind E. Coli-Stämme, wie BL21 (vgl. Studier, F.W. et al., Methods in Enzymology 185 (1990), 60–89), während als letztere insbesondere Säugetier-, Hefe- und Insektenzellen zu nennen sind. Unter Genmanipulationen sind übliche aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren zu verstehen, mit denen Nukleinsäuren bestimmter Sequenzen hergestellt, in Zellen eingeführt und exprimiert werden. Der Fachmann kennt hierfür geeignete Materialien, wie Vektoren, und Bedingungen (vgl. z. B. Maniatis, T. et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982).

Vorliegend wird eine hdm-2-cDNA aus A-204-Zellen (vgl. vorstehend) in üblicher Weise revers transkribiert und in einem gängigen PCR-Verfahren amplifiziert. Die cDNA wird in ihrer Sequenz mit publizierten Daten (z. B. EMBL-Genbank) verglichen und in den bekannten Vektor pET 3d inseriert, wodurch der rekombinante Vektor pET 92/2 erhalten wird. Dieser wird zur Expression von hdm-2 in den Bakterienstamm BL21 (vgl. vorstehend) transformiert. Eine hdm-2-Induktion wird durch Zugabe von IPTG erreicht. Die Bakterien werden sedimentiert und nach Einfrieren und Auftauen einer Lysozym- und DNaseI-Behandlung unterzogen. Die Lysate werden mit Harnstofflösungen verschiedener Konzentrationen inkubiert und nach Zentrifugation wird freigesetztes hdm-2 durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Elektroelution in reiner Form bereitgestellt. Der Fachmann kennt vorstehende Verfahren und hierzu notwendige Materialien und Bedingungen.

Erfnungsgemäß werden hdm-2-Fragmente bereitgestellt, die Bindungsregionen für hdm-2-spezifische Antikörper enthalten. Diese Fragmente werden nachstehend mit hdm-2-AKBR-Fragmenten bezeichnet. Vorzugsweise umfassen die hdm-2-AKBR-Fragmente die Aminosäuren 1-284, 58-284 und 58-491 von hdm-2 (vgl. Fig. 1).

Zur Herstellung von hdm-2-AKBR-Fragmenten können mehrere Verfahren verwendet werden. Als günstig hat sich ein Verfahren erwiesen, bei dem man über die Gesamtlänge von hdm-2 verteilt Fragmente konstruiert, wobei jeweils mindestens zwei Fragmente einen überlappenden Bereich aufweisen, die Fragmente mit einem hdm-2-spezifischen Antikörper reagieren läßt und den überlappenden, durch den Antikörper gebundenen Bereich identifiziert und als hdm-2-AKBR-Fragment bereitstellt sowie dieses ggf. als Basis für eine ein- oder mehrfache Wiederholung obigen Zyklus verwendet.

Ausgangspunkt für dieses Verfahren ist eine aus A-204-Zellen erhaltene hdm-2-cDNA (vgl. vorstehend). Von dieser werden über die Gesamtlänge der cDNA verteilt DNA-Fragmente in einem gängigen PCR-Verfahren amplifiziert, wobei jeweils mindestens zwei Fragmente einen überlappenden Bereich aufweisen. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden, wie vorstehend beschrieben, in pET 3d inseriert und nach Transformation und IPTG-Induktion im Bakterienstamm BL21 exprimiert. Die erhaltenen hdm-2-Fragmente werden, wie vorstehend für hdm-2 beschrieben, isoliert und einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Dieser folgt eine Westernblot-Analyse, worin markierte, allgemein erhältliche hdm-2-spezifische Antikörper, z. B. JF2, zur Bindung an die hdm-2-Fragmente eingesetzt werden. Durch Bindung eines dieser Antikörpers an zwei einen überlappenden Bereich aufweisende hdm-2-Fragmente wird die Bindungsregion des Antikörpers dem überlappenden Bereich zugewiesen. Dieser Bereich wird als mit hdm-2-AKBR bezeichnetes Fragment bereitgestellt. Hierfür wird z. B. ein gängiges PCR-Verfahren angewandt. Mit dem hdm-2-AKBR-Fragment kann vorstehender

Zyklus ein- oder mehrfach wiederholt werden, um die Bindungsregion des hdm-2-spezifischen Antikörpers noch weiter einzugrenzen. Diese Bindungsregion kann bis auf wenige Aminosäuren eingegrenzt werden. Die hierzu u. U. notwendigen kurzen hdm-2-Fragmente können synthetisch hergestellt werden. Dem Fachmann sind die vorstehenden Verfahren und die zu ihrer Durchführung notwendigen Materialien und Bedingungen bekannt.

Erfnungsgemäß werden auch die für hdm-2-AKBR-Fragmente codierenden DNA-Sequenzen bereitgestellt. Vorzugsweise umfassen diese DNA-Sequenzen die für die Aminosäuren 1-284, 58-284 und 58-491 von hdm-2 codierenden Nukleotide (vgl. Fig. 2).

Erfnungsgemäß werden hdm-2 und/oder hdm-2-AKBR-Fragmente an ein Trägermaterial gebunden. Selbstverständlich kann auch ein einzelnes hdm-2-AKBR-Fragment oder dieses zusammen mit hdm-2 gebunden werden. Als Trägermaterial kann jegliches zur Bindung von Proteinen geeignete Material, insbesondere Mikrotiterplatten, Röhrchen, Mikrokugeln und Objekträger, verwendet werden. Bei sehr kleinen hdm-2-AKBR-Fragmenten, insbesondere Peptiden, ist es ratsam die Bindung an das Trägermaterial über einen üblichen Carrier, z. B. BSA, erfolgen zu lassen. Eine solche Bindung wie auch eine ohne Carrier, kann nach üblichen Verfahren erzielt werden. Vorliegend werden Mikrotiterplatten als Trägermaterial verwendet. Hierzu werden hdm-2 und/oder hdm-2-AKBR-Fragmente in Carbonatpuffer bzw. Harnstoff-Phosphatpuffer aufgenommen, verschieden verdünnt und in die Löcher einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C folgen mehrere Waschschritte in physiologischem Puffer. Die Bindung von hdm-2 und/oder der hdm-2-AKBR-Fragmente ist stabil.

Erfnungsgemäß werden gebundenes hdm-2 und/oder gebundene hdm-2-AKBR-Fragmente mit Körperflüssigkeiten inkubiert. Als solche sind sämtliche Flüssigkeiten gemeint, die aus einem tierischen Körper, insbesondere einem Säugetier und ganz besonders einem Menschen erhalten werden können. Die Flüssigkeiten umfassen vorzugsweise Serum, Lymph, Speichel und Urin. Ferner gehören zu ihnen auch Flüssigkeiten, die aus festen Geweben, wie Lunge, Gehirn und Knochenmark, sowie aus Tumoren, wie Colorektal-Karzinom und Hepatozell-Karzinom sowie Sarkomen isoliert werden können. Die Inkubation erfolgt nach üblichen Verfahren. Vorliegend werden Seren von Patienten verschieden verdünnt und gebundenem hdm-2 und/oder gebundenen hdm-2-AKBR-Fragmenten in der Mikrotiterplatte zugegeben. Nach 1ständiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschritte in physiologischem Puffer. Die Bindung von spezifischen Anti-hdm-2-Antikörpern ist stabil.

Erfnungsgemäß werden solche gebundenen Antikörper (nachstehend mit Antikörper (a) bezeichnet)

- mit markierten, gegen die Antikörper (a) gerichteten Antikörpern (b), oder
- mit unmarkierten Antikörpern (b) und letztere mit markierten, gegen die Antikörper (b) gerichteten Antikörpern (c) umgesetzt.

30

Die Markierung kann radioaktiv oder nicht-radioaktiv sein. Im letzteren Fall werden andere übliche Marker verwendet. Geeignet sind insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe, wie z. B. Fluoresceinisothiocyanat, und Enzyme, wie alkalische Phosphatase oder Peroxidase. Als Verstärkersystem kann ein Biotin/Streptavidinkomplex eingesetzt werden. Die Marker sind allgemein erhältlich. Die Konjugierung mit den Antikörpern (b) oder (c) erfolgt nach den Vorschriften des Herstellers. Auch sind bereits markierte Antikörper (b) und (c) allgemein erhältlich.

35

Die Wahl der geeigneten Antikörper (b), ob markiert oder unmarkiert, hängt davon ab, von welchem Tier bzw. welcher Tierart die verwendete Körperflüssigkeit stammt. Handelt es sich beispielsweise um eine Flüssigkeit aus einem Menschen, so werden als Antikörper (b) solche verwendet, die gegen humanes Immunoglobulin gerichtet sind. In entsprechender Weise werden, sofern zusätzlich noch Antikörper (c) eingesetzt werden, diese bezüglich des Tiers oder der Tierart ausgewählt, aus der die Antikörper (b) stammen. Die Wahl geeigneter Antikörper ist dem Fachmann bekannt und kann ohne weiteres durchgeführt werden.

40

Die Umsetzung von gebundenen Antikörpern (a) mit markierten Antikörpern (b) bzw. mit unmarkierten Antikörpern (b) und dann mit markierten Antikörpern (c) kann in üblicher Weise erfolgen. Vorliegend findet die Umsetzung mit den Antikörpern (b) in beiden Alternativen innerhalb von 1 h bei 37°C statt. Nach mehreren Waschvorgängen wird in der ersten Alternative eine dem Marker entsprechende Substratlösung zur Entwicklung der Nachweisreaktion zugegeben. Dies erfolgt gemäß der Anleitung des Herstellers. In der zweiten Alternative werden nach den Waschvorgängen die Antikörper (c) zugegeben. Deren Umsetzung und die Entwicklung der Nachweisreaktion erfolgen in entsprechender Weise.

45

Das erfungsgemäß Verfahren weist eine hohe Sensitivität auf. Diese ist besonders hoch, wenn auch die Antikörper (c) eingesetzt werden. Darüber hinaus ist das vorliegende Verfahren rasch in jedem Labor durchführbar. Besondere Sicherheitsvorkehrungen sind hierfür nicht zu treffen. Das erfungsgemäß Verfahren eignet sich daher besonders zur Durchführung größerer Reihenuntersuchungen.

50

Erfungsgemäß wird auch ein Kit bereitgestellt, der zur Durchführung vorstehender Verfahren geeignet ist. Dieser Kit enthält

55

- Trägermaterial-gebundenes hdm-2 und/oder Trägermaterial-gebundene hdm-2-AKBR-Fragmente und markierte Antikörper (b) sowie übliche Waschpuffer und gegebenenfalls ein der Markierung entsprechendes Substrat oder
- Trägermaterial-gebundenes hdm-2, und/oder Trägermaterial-gebundene hdm-2-AKBR-Fragmente, unmarkierte Antikörper (b) und markierte Antikörper (c) sowie übliche Waschpuffer und gegebenenfalls ein der Markierung entsprechendes Substrat.

60

Für die Markierung wie auch die anderen Komponenten des Kits gelten die vorstehend für das erfungsgemäß Verfahren gemachten Ausführungen.

65

Kurze Erläuterung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt die Aminosäuresequenzen von bevorzugten hdm-2-AKBR-Fragmenten.
 Fig. 2 zeigt die DNA-Sequenzen der in Fig. 1 aufgeführten hdm-2-AKBR-Fragmente.
 Die vorliegende Erfindung wird durch die Beispiele erläutert.

5

Beispiel 1

Expression von hdm-2 und His-hdm-2-Fusionsprotein

A) Expression von hdm-2

Aus der Zelllinie A-204 (vgl. vorstehend) wurde eine hdm-2 cDNA mit einem "hexamer random primer" revers transkribiert und mittels der Oligoprimer "Fhdm-2-B" und "Rhdm-2" in einem gängigen PCR-Verfahren amplifiziert (Sequenz "Fhdm-2-B": CGC GGA TCC ATG TGC AAT ACC AAC ATG TCT G; "Rhdm-2": CGC GGA TCC TCA GGG GAA ATA AGT TAG CAC AAT C;) Die amplifizierte Sequenz wurde mit publizierten Daten (EMBL-Genbank) verglichen und über die Restriktionsenzymstelle BamHI in beiden PCR-Primern unter Erhalt des gesamten codierenden Bereichs in dem Vektor pET 3d im Bakterienstamm HMS 174 kloniert. Zur Expression von hdm-2 wurde der erhaltene Vektor pET 93/9 in den Bakterienstamm BL21 (vgl. vorstehend) transformiert. Nach Kultivierung der Bakterien bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (600 nm) in 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol enthaltendem LB-Medium wurde eine 3stündige Induktion von hdm-2 bei 30°C mit 2 mM IPTG durchgeführt.

(B) Expression von His-hdm-2-Fusionsprotein

Aus der Zelllinie A-204 (vgl. vorstehend) wurde eine hdm-2 cDNA, revers transkribiert und mittels der Oligoprimer "Fhdm-2-B" und "Rhdm-2" (vgl. vorstehend) durch PCR amplifiziert. Die amplifizierte Sequenz wurde über BamHI-Schnittstellen in beiden PCR-Primern in dem bekannten, mit BamHI geöffneten Expressionsvektor pQE-8 kloniert. Die Expression dieses am N-terminalen Ende mit 6 Histidinen verknüpften hdm-2-Proteins erfolgte im Bakterienstamm E. coli SG13009 (vgl. Gottesmann, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981) 265–273). Nach Kultivierung der Bakterien bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin wurde eine 6stündige Induktion von His-hdm-2-Fusionsprotein bei 37°C mit 1 mM IPTG durchgeführt.

Beispiel 2

Isolierung und Reinigung von hdm-2 und His-hdm-2-Fusionsprotein

(A) Isolierung und Reinigung von hdm-2

400 ml Bakterienkultur von Beispiel 1, (A) wurden nach der hdm-2-Induktion durch 10minütige Zentrifugation bei 500 g sedimentiert, in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Einfrieren und Auftauen wurde das Sediment in 1,6 ml eines Lyse-Puffers resuspendiert (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% Saccharose). Nacheinander wurden hierzu Lysozym (Endkonz. 2 mg/ml) und 0,5M EDTA (Endkonz. 50 mM) zugegeben. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wurden MgCl₂ (Endkonz. 80 mM) und DNase 1 (250 µg) zugegeben, gefolgt von einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (Endvolumen 6,5 ml). Hierzu wurden 10 µl 0,1M PMSF gegeben und das Gemisch wurde 15 Minuten bei 10 000 g, 4°C zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde dreimal wiederholt, und zwar jeweils nach Resuspendieren des Sediments und 10minütiger Inkubation in 1M, 3M bzw. 7M Harnstoff mit PMSF (0,1M, 10 µl). Der Überstand des letzten Zentrifugationsschritts wurde wie folgt weiter aufgereinigt: Nach Gelelektrophorese in einem 10% Polyacrylamidgel, Ausschneiden der gewünschten Proteinbande und Elektroelution über Nacht bei 4°C in 25 mM Tris-HCl, 0,2M Glycin, 0,5% SDS, pH 8,8 in einer allgemein erhältlichen Biotrap-Elutionskammer wurde hdm-2 in reiner Form erhalten.

(B) Isolierung und Reinigung von His-hdm-2-Fusionsprotein

250 ml Bakterienkultur von Beispiel 1, (B) wurden nach der Induktion des His-hdm-2-Fusionsproteins sedimentiert und einmal in 40 ml PBS gewaschen. Je 1 g Bakterienpellet wurde in 3 ml Lösung A für 1 min beschallt und anschließend bei RT 8–12h bei mittlerer Geschwindigkeit auf einem Magnetrührer gerührt. Die erhaltene Suspension wurde erneut bei RT für 30 min bei 15 000 rpm sedimentiert. 2–6 ml des dabei erhaltenen Überstands wurden auf eine allgemein bekannte Nickel-Chelat-Chromatographiesäule (Ni-NTA-Resin) gegeben. Das Säulenmaterial war zuvor mit 3 Säulenvolumina Lösung A (vgl. nachstehend) gewaschen worden. Die Säule wurde nach Aufladen des Bakterienextrakts nacheinander mit Lösung A bis F gewaschen und zwar mit 2–3 Säulenvolumina der entsprechenden Lösung, solange bis kein Protein mehr eluiert werden konnte. Der Proteingehalt der aufgefangenen Fraktionen wurde durch Extinktionsmessung bei 280 nm photometrisch bestimmt, wobei 1 O.D. ca. 1 mg Protein/ml entsprach. Das His-hdm-2-Fusionsprotein war in den Fraktionen nach Elution mit Lösung D oder E enthalten, wobei in der Regel nur ein sehr geringer Anteil bakterieller Proteine enthalten war. Um diesen Anteil zu entfernen, wurde ggfs. das eluierte Protein nochmals an die Ni-NTA-Resin-Säule gebunden, indem der pH-Wert der vereinigten Fraktionen mit der Hauptmenge des zu reinigenden Proteins auf pH 8,0 eingestellt wurde und diese dann nochmals auf die Säule gegeben wurden. Die anschließende Elution

erfolgte mit Lösung A bis F, wie vorstehend beschrieben. Die Reinheit und Qualität des eluierten His-hdm-2-Fusionsproteins wurde durch SDS-PAGE geprüft.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Lösung A:

6M Guanidinium Hydrochlorid, 0,1M NaH₂PO₄, 10mM β-Mercaptoethanol, 0,01M TrisHCl, pH 8,0

5

Lösung B:

8M Harnstoff, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M TrisHCl, pH 8,0

Lösung C:

8M Harnstoff, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M TrisHCl, pH 6,3

10

Lösung D:

8M Harnstoff, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M TrisHCl, pH 5,9

Lösung E:

8M Harnstoff, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M TrisHCl, pH 4,5

Lösung F:

6M Guanidinium Hydrochlorid, 0,2M Essigsäure.

15

Vorstehendes Verfahren von (B) zeichnet sich durch eine extrem schnelle und effiziente Aufreinigung des exprimierten Proteins aus.

20

Beispiel 3

Herstellung von hdm-2-AKBR- und His-hdm-2-AKBR-Fragmenten

(A) Herstellung eines hdm-2-AKBR-Fragments

25

Von der aus der Zelllinie A-204 (vgl. vorstehend) erhaltenen cDNA wurden zwei sich überlappende DNA-Sequenzen mittels der Oligoprimer-Paare "Fhdm2-B"/"Rhdm2-284" und "Fhdm2-58/Rhdm2-284" in einem gängigen PCR-Verfahren amplifiziert. Die eine DNA-Sequenz codierte für ein hdm-2-Fragment der Aminosäuren 1–284, während die andere für ein hdm-2-Fragment der Aminosäuren 58–284 codierte. Die Sequenzen der verwendeten Oligoprimer waren wie folgt "Fhdm-2-B" (vgl. vorstehend); "Rhdm-2-284": CGC GGA TCC TCA CCC TGC CTG ATA CAC AGT AAC; "Fhdm-2-58": CGC GGA TCC GGC CAG TAT ATT ATG ACT AAA C.

30

Die amplifizierten Sequenzen wurden mit publizierten Daten (EMBL-Genbank) verglichen und über die Restriktionsenzymstelle BamHI in den Vektor pET 3d (vgl. vorstehend) kloniert. Die Expression der Sequenzen erfolgte nach Transformation und IPTG-Induktion im Bakterienstamm BL21 (vgl. vorstehend). Die exprimierten Sequenzen (hdm-2-Fragmente) wurden, wie in Beispiel 2(A) für hdm-2 beschrieben, isoliert und einer Polyacrylamid-Gelektrophorese unterzogen. Dieser folgte eine übliche Westernblot-Analyse, worin ein allgemein erhältlicher hdm-2-spezifischer Antikörper zur Bindung an die hdm-2-Fragmente verwendet wurde. Dieser Antikörper zeigte eine Bindung an beide sich überlappende hdm-2-Fragmente. Der überlappende Bereich, d. h. die Aminosäuren 58–284, wurde als Bindungsregion des Antikörpers angesehen.

35

40

(B) Herstellung eines His-hdm-2-AKBR-Fragments

45

Von der aus der Zelllinie A-204 (vgl. vorstehend) erhaltenen cDNA wurden zwei sich überlappende DNA-Sequenzen mittels der Oligoprimer-Paare "Fhdm-2-B"/"Fhdm-2-284" und "Fhdm-2-58"/"Rhdm-2-284" in einem gängigen PCR-Verfahren amplifiziert.

50

Die amplifizierten Sequenzen wurden mit publizierten Daten (EMBL-Genbank) verglichen und über die Restriktionsenzymstelle BamHI in den Vektor pQE-8 (vgl. vorstehend) kloniert. Die Expression der Sequenzen erfolgte nach Transformation und IPTG-Induktion im Bakterienstamm E.coli SG 13009 (vgl. vorstehend). Die exprimierten Sequenzen (His-hdm-2-Fragmente) wurden, wie in Beispiel 2(B) für His-hdm-2-Fusionsprotein beschrieben, isoliert und einer Polyacrylamid-Gelektrophorese unterzogen. Dieser folgte eine übliche Westernblot-Analyse, worin ein allgemein erhältlicher hdm-2-spezifischer Antikörper zur Bindung an die His-hdm-2-Fragmente verwendet wurde. Dieser Antikörper zeigte eine Bindung an beide sich überlappende hdm-2-Fragmente. Wie vorstehend in (A) wurde der überlappende Bereich, d. h. die Aminosäuren 58–284, als Bindungsregion des Antikörpers angesehen.

55

Beispiel 4

Nachweis von spezifischen hdm-2-Antikörpern im Serum von Patienten durch hdm-2

60

Zur Durchführung eines ELISA wurde hdm-2 aus Beispiel 2, (B) in Harnstoff-Puffer (3M Harnstoff, 0,1M NaH₂PO₄, pH 8,0) aufgenommen. Zur Beschichtung einer 96-Loch-Platte wurden pro Loch je 100 µl mit 20 ng bzw. 8 ng Antigen sowie einmal 1% BSA als Leerkontrolle eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C schlossen sich 3 kurze Waschschritte mit PBS an. Anschließend erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen des polymeren Trägers durch einstündige Inkubation mit 1% BSA in PBS bei 37°C. Ein zu testendes Serum eines Patienten mit einem kleinzelligen Bronchial-Karzinom wurde in 1 : 100 Verdünnung (PBS, 1% BSA, 0,05% Tween 20) für 1 Stunde bei 37°C auf der Platte inkubiert ("Schachbrett-Titration"). Nach 8 Waschschritten mit

65

PBS (0.05% Tween 20) wurde ein allgemein erhältlicher Peroxidase-gekoppelter Ziege Anti-Human Antikörper (Verdünnung nach Angabe der Hersteller) zugegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37°C folgten 8 Waschschritte und anschließend die Peroxidase-Nachweisreaktion mit TMB-Entwicklungsösung (50 mM Natriumacetat, 0.4 mM 3,3', 5,5'-Tetramethyl-benzidin-dihydrochlorid, 4,4 mM H₂O₂) innerhalb 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 2M HCl wurde die Farbintensität photometrisch bei 450 nm bestimmt. Absorptionswerte des mehr als doppelten der BSA-Kontrolle wurden als positive Reaktion gewertet.

Die Tabelle zeigt die Daten eines entsprechend durchgeföhrten ELISA im Vergleich zur Bestimmung spezifischer Antikörper mittels Immunoblot. Die nahezu vollständige Übereinstimmung beider Verfahren weist den Anti-hdm-2 ELISA als geeignetes Verfahren zur Reihentestung klinischen Materials aus. Ferner zeigt der ELISA eine größere Sensitivität als der Immunoblot, wodurch die Eignung des ELISA als Erstuntersuchungsverfahren unterstrichen wird.

Tabelle

Vergleich des Nachweises von hdm-2-Antikörpern in Seren von Patienten mit Bronchialkarzinom durch Immunblot und ELISA mit rekombinatem hdm-2

	Serum-Code:	1000	1001	1100	1502	1503	2102
Immunblot:	-	-	-	+	+	+	
ELISA:	-	-	-	+	+	+	

Legende: Immunblot:

+: sichtbare Bande auf der Höhe von 90 kD Molekulargewicht bei einer Serumverdünnung von 1:100, Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem, human-spezifischen Ziegen-Antikörper (Dianova, 1:20000) und Peroxidase-Nachweisreaktion.

-: kein sichtbares Signal

ELISA:

+ : Absorptionswert des wenigstens 2-fachen des BSA-Kontrollwerts
 - : Absorptionswert \leq des BSA-Kontrollwerts

Die Tabelle zeigt, daß die Ergebnisse von Immunblot und ELISA übereinstimmen, wobei die größere Sensitivität des ELISA auf eine Eignung als Erstuntersuchungsmethode hindeutet.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von hdm-2-spezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß man Trägermaterial-gebundenes hdm-2 und/oder Trägermaterialgebundene, Bindungsregionen für hdm-2-spezifische Antikörper aufweisende Fragmente davon mit Körperflüssigkeiten inkubiert und die spezifischen, an das hdm-2 und/oder die Fragmente gebundenen Antikörper (a)
 - mit markierten, gegen die Antikörper (a) gerichteten Antikörpern (b), oder
 - mit unmarkierten Antikörpern (b) und letztere mit markierten, gegen die Antikörper (b) gerichteten Antikörpern (c) reagieren läßt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeiten Serum, Lymphe, Speichel und Urin sowie aus festen Geweben und Tumoren erhaltene Flüssigkeiten umfassen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das hdm-2 durch Expression einer cDNA-Sequenz erhalten ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die hdm-2-Fragmente die Aminosäuren 1-284, 58-284 und 58-491 von hdm-2 umfassen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial Mikrotiterplatten, Röhrchen, Mikrokugeln und Objektträger umfaßt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper (b) in der ersten Alternative und die Antikörper (c) in der zweiten Alternative mit einem Enzym markiert sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper (b) in der ersten Alternative und die Antikörper (c) in der zweiten Alternative mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper (b) in der ersten Alternative und die Antikörper (c) in der zweiten Alternative radioaktiv markiert sind.
9. Kit, enthaltend
- Trägermaterial-gebundenes hdm-2 und/oder Trägermaterial-gebundene, Bindungsregionen für hdm-2-spezifische Antikörper aufweisende Fragmente davon und markierte Antikörper (b) nach Anspruch 1 sowie übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat oder
 - Trägermaterial-gebundene hdm-2 und/oder Trägermaterial-gebundene, Bindungsregionen für hdm-2-spezifische Antikörper aufweisende Fragmente davon und unmarkierte Antikörper (b) und markierte Antikörper (c) nach Anspruch 1 sowie übliche Waschpuffer und ggf. ein der Markierung entsprechendes Substrat.
10. hdm-2-Fragment mit Bindungsregion für hdm-2-spezifischen Antikörper.
11. hdm-2-Fragment nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuren 1-284, 58-284 und 58-491 von hdm-2 umfaßt.
12. DNA-Sequenz eines hdm-2-Fragments nach Anspruch 10.
13. DNA-Sequenz eines hdm-2-Fragments nach Anspruch 11.
14. Verfahren zur Herstellung eines hdm-2-Fragments mit Bindungsregion für hdm-2-spezifischen Antikörper, bei dem man über die Gesamtlänge von hdm-2 verteilt Fragmente in üblicher Weise konstruiert, wobei jeweils mindestens 2 Fragmente einen überlappenden Bereich aufweisen, die Fragmente mit einem hdm-2-spezifischen Antikörper reagieren läßt und den überlappenden, durch den Antikörper gebundenen Bereich identifiziert und als eingangs definiertes Fragment in üblicher Weise bereitstellt sowie dieses ggf. als Basis für eine ein- oder mehrfache Wiederholung des Zyklus verwendet.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

60

65

Figur 1 (Fortsetzung)

Fragment 3: Aminosäuresequenzen 58-491

1 GQYIMTKRLY DEKQQHIVYC SNDLLGDLFG VPSFSVKEHR KIYTMIYRNL
51 VVVNQQESSD SGTSVSENRC HLEGGSDQKD LVQELQEEKP SSSHLVSRPS
101 TSSRRRAISE TEENSDELSG ERQRKRHKSD SISLSFDESL ALCVIREICC
151 ERSSSSESTG TPSNPDLDAAG VSEHSGDWLD QDSVSDQFSV EFEVESLDSE
201 DYSLSEEGQE LSDEDDEVYQ VTVYQAGESD TDSFEEDPEI SLADYWKCCTS
251 CNEMNPPLPS HCNRCWALRE NWLPEDKGKD KGEISEKAKL ENSTQAEEGF
301 DVPDCKKTIV NDSRESCVEE NDDKITQASQ SQESEDYSQP STSSSIIYSS
351 QEDVKEFERE ETQDKEESVE SSLPLNAIEP CVICQGRPKN GCIVHGKTGH
401 LMACFTCAKK LKKRNKPCPV CRQPIQMIVL TYFP

Figur 2: DNA-Sequenzen von hdm-2-AKBR-Fragmenten**Fragment 1: DNA-Sequenzen 1-852 (=Aminosäuresequenzen 1-284)**

1 ATGTGCAATA CCAACATGTC TGTACCTACT GATGGTGCTG TAACCACCTC
51 ACAGATTCCA GCTTCGGAAC AAGAGACCCCT GGTTAGACCA AAGCCATTGC
101 TTTTGAAGTT ATTAAAGTCT GTTGGTGCAC AAAAAGACAC TTATACTATG
151 AAAGAGGTTC TTTTTATCT TGGCCAGTAT ATTATGACTA AACGATTATA
201 TGATGAGAAG CAACAACATA TTGTATATTG TTCAAATGAT CTTCTAGGAG
251 ATTTGTTTGG CGTGCCAAGC TTCTCTGTGA AAGAGCACAG GAAAATATAT
301 ACCATGATCT ACAGGAACCT GGTAGTAGTC AATCAGCAGG AATCATCGGA
351 CTCAGGTACA TCTGTGAGTG AGAACAGGTG TCACCTTGAA GGTGGGAGTG
401 ATCAAAAGGA CCTTGTACAA GAGCTTCAGG AAGAGAAACC TTCATCTTCA
451 CATTGGTTT CTAGACCATC TACCTCATCT AGAAGGAGAG CAATTAGTGA
501 GACAGAAGAA AATTCAAGATG AATTATCTGG TGAACGACAA AGAAAACGCC
551 ACAAAATCTGA TAGTATTTCC CTTTCCTTG ATGAAAGCCT GGCTCTGTGT
601 GTAATAAGGG AGATATGTTG TGAAAGAAC AGTAGCAGTG AATCTACAGG
651 GACGCCATCG AATCCGGATC TTGATGCTGG TGTAAGTGAAC CATTCAAGGTG
701 ATTGGTTGGA TCAGGATTCA GTTTCAGATC AGTTTAGTGT AGAATTTGAA
751 GTTGAATCTC TCGACTCAGA AGATTATAGC CTTAGTGAAG AAGGACAAGA
801 ACTCTCAGAT GAAGATGATG AGGTATATCA AGTTACTGTG TATCAGGCAG
851 GG

Figur 2 (Fortsetzung)

Fragment 2: DNA-Sequenzen 1-681 (=Aminosäuresequenzen 58-284)

1 GGCCAGTATA TTATGACTAA ACGATTATAT GATGAGAAGC AACAAACATAT
51 TGTATATTGT TCAAATGATC TTCTAGGAGA TTTGTTGGC GTGCCAAGCT
101 TCTCTGTGAA AGAGCACAGG AAAATATATA CCATGATCTA CAGGAACATTG
151 GTAGTAGTCA ATCAGCAGGA ATCATCGGAC TCAGGTACAT CTGTGAGTGA
201 GAACAGGTGT CACCTTGAAG GTGGGAGTGA TCAAAAGGAC CTTGTACAAG
251 AGCTTCAGGA AGAGAAACCT TCATCTTCAC ATTTGGTTTC TAGACCATCT
301 ACCTCATCTA GAAGGAGAGC AATTAGTGAG ACAGAAGAAA ATTCAAGATGA
351 ATTATCTGGT GAACGACAAA GAAAACGCCA CAAATCTGAT AGTATTCCC
401 TTTCCTTGA TGAAAGCCTG GCTCTGTGTG TAATAAGGGA GATATGTTGT
451 GAAAGAAGCA GTAGCAGTGA ATCTACAGGG ACGCCATCGA ATCCGGATCT
501 TGATGCTGGT GTAAGTGAAC ATTCAAGGTGA TTGGTTGGAT CAGGATTCA
551 TTTCAGATCA GTTTAGTGTGTA GAATTGAAAG TTGAATCTCT CGACTCAGAA
601 GATTATAGCC TTAGTGAAGA AGGACAAGAA CTCTCAGATG AAGATGATGA
651 GGTATATCAA GTTACTGTGT ATCAGGCAGG G

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**